

荧光假单胞杆菌 2P24 中 *gacA*、*dsbA* 和 *phoP/phoQ* 基因对小 RNA 因子 RsmZ 的转录调控

姜维芳, 吴小刚, 闫庆, 张力群*

(中国农业大学植物病理系, 北京 100193)

摘要: *Pseudomonas fluorescens* 2P24 是分离自麦田的植物病害生物防治菌株, 产生抗生素 2, 4-二乙酰基间苯三酚 (2,4-diacetylphloroglucinol; 2,4-DAPG) 是其主要防病机制。菌株 2P24 中小 RNA 基因 *rsmZ* 正调控抗生素 2,4-DAPG 的产量。【目的】本文研究上游调控因子对 *RsmZ* 转录表达的影响, 以进一步理解抗生素产生机制。【方法】构建了 *rsmZ::lacZ* 的转录融合结构, 将含有该结构的报告载体转入 2P24 的多个调控基因缺失突变体中, 检测相应的缺失基因对 *rsmZ* 转录水平的调控作用。

【结果】结果表明, 反应调控因子 GacA 对 *rsmZ* 基因的转录具有正调控作用, 二硫键合成蛋白 DsbA 对其负调控; 双因子调控系统 PhoP/PhoQ 突变后, *rsmZ* 基因的转录明显滞后。【结论】小 RNA 基因 *rsmZ* 在菌株 2P24 中受到多个基因的调控, 并在信号传递网络中起到重要作用。

关键词: 假单胞杆菌; 小 RNA; RsmZ; 转录

中图分类号: Q933 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2008) 12-1588-07

小 RNA (small RNAs 或 sRNAs) 是一类长度为 40~400 个核苷酸的非编码 RNA 分子, 广泛存在于从细菌到哺乳动物等多种不同的生物体内, 执行多种生物学功能, 如 mRNA 分子的翻译抑制、降解断裂等^[1]。在荧光假单胞杆菌 *Pseudomonas fluorescens* CHA0 中存在 RsmA 和 RsmE 两个小分子阻遏蛋白, 它们通过与目标基因 mRNA 的核糖体结合位点结合, 达到阻碍蛋白合成的效果; 小 RNA 因子 RsmX、RsmY 和 RsmZ 则竞争性结合 RsmA 和 RsmE, 释放 mRNA 的核糖体结合位点, 从而促进其翻译^[2]。类似的调控模式也存在于 *P. fluorescens* F113^[3]、*P. aeruginosa* PAO1^[4]和 *Pseudomonas* sp. M18^[5]等多个假单胞杆菌菌株中。小 RNA 因子通过这种方式调控胞外蛋白和次生代谢产物的合成^[2]。

假单胞杆菌中小 RNA 的转录表达受到多种因子的调控。双因子系统 (two-component regulatory

system) GacS/GacA 即是一个重要的调控因子, 其感受激酶 GacS 识别信号后进行自身磷酸化, 随后将磷酸基团转移到胞内调控因子 GacA, 磷酸化的 GacA 调节下游基因的表达^[6]。在 *P. fluorescens* CHA0 中小 RNA RsmX, RsmY 和 RsmZ 的转录受到 GacS/GacA 双因子调控系统的正调控^[2]; 对 *P. aeruginosa* 的研究中也有类似的结果^[7]。还有研究表明 *P. fluorescens* 和 *P. aeruginosa* 中小 RNA 受到小分子阻遏蛋白 RsmA 和 RsmE 的正调控^[2, 7]。

P. fluorescens 2P24 分离自山东小麦全蚀病自然衰退土壤, 该菌可以产生多种抗菌物质, 其中抗生素 2,4-二乙酰基间苯三酚 (2,4-diacetylphloroglucinol; 2,4-DAPG) 在病害防治中起关键作用^[8, 9]。此外, 群体感应 (Quorum sensing, QS) 系统 PcoI/PcoR 对菌株 2P24 在根围的定殖能力起正调控作用, 也是菌株

基金项目: 国家自然科学基金(30671403); 国家“863 计划”(2006AA10A211); MOST-DEST 国际合作项目(2007DFA31570)

*通讯作者。Tel: +86-10-62731464; E-mail: zhanglq@cau.edu.cn

作者简介: 姜维芳(1981-), 男, 山东烟台人, 硕士研究生, 研究方向是微生物分子遗传学。E-mail: weifangjiang@gmail.com

收稿日期: 2008-05-20; 修回日期: 2008-08-29

生防能力的重要调控因子^[10]。前期实验证明, 菌株 2P24 中 QS 系统的转录和抗生素的合成受到许多基因的调控, 如 *GacS/GacA* 双因子调控系统^[11], *PhoP/PhoQ* 双因子调控系统, 二硫键形成蛋白 *DsbA* 等(未发表)。这些基因在菌株 2P24 中调控生防能力的机制尚不清楚, 其中部分过程可能有小 RNA 因子的参与。*RsmZ* 是 2P24 中的一个小 RNA 因子, 本研究从遗传学角度证明 2P24 中 *RsmZ* 对抗生素产量起到正调控作用, 并初步探讨 *gacA*, *phoP/phoQ* 和 *dsbA* 基因对 *rsmZ* 基因转录的影响, 以上研究结果有利于进一步理解菌株 2P24 的防病机制, 并为菌株的改造

提供遗传材料。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株、质粒和培养条件: 本实验所用菌株、质粒和引物见表 1 和表 2。*P. fluorescens* 2P24 及其衍生菌株在 LB 培养基中 28 培养, *Escherichia coli* 在 LB 培养基中 37 培养。抗生素使用终浓度分别为: 氨苄青霉素 (ampicillin, Ap) 100 μg/mL, 卡那霉素 (kanamycin, Km) 50 μg/mL, 四环素 (tetracycline, Tet) 20 μg/mL。

表 1 本研究使用的菌株和质粒
Table 1 Strains, plasmids and primers used in this study

Strains/Plasmids	Relevant characteristics	Reference or origin
Strains		
<i>P. fluorescens</i>		
2P24	wild type; Ap ^r	8
PM106	<i>dsbA</i> gene in-frame deletion; Ap ^r	This study
PM201	<i>gacA</i> gene in-frame deletion; Ap ^r	11
PM501	<i>rsmZ</i> gene in-frame deletion; Ap ^r	This study
PM501-RsmZ	PM501 containing p415G-Z; Ap ^r , Tet ^r	This study
PM402	<i>phoQ</i> gene in-frame deletion; Ap ^r	This study
PM404	<i>phoP</i> gene in-frame deletion; Ap ^r	This study
<i>Escherichia coli</i>		
DH5α	<i>supE44 lacU169 (φ80lacZ M15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1</i>	13
Plasmids		
pHSG 299	cloning vector; ColE1 origin; Km ^r	TaKaRa
pBluescript SK+	cloning vector; ColE1 replicon; Ap ^r	Stratagene
pBS-29-E	pBluescript II SK+ carrying a 4.5kb fragment containing <i>rsmZ</i> gene; Ap ^r	11
p299ΔRsmZ	pHSG 299 carrying a 1.9 kb <i>PstI-EcoRI</i> fragment lacking 127bp of <i>rsmZ</i> gene; Km ^r	This study
pRK415G	Broad-host cloning vector; IncP1 replicon; polylinker of pUC19; Mob ⁺ ; Tet ^r	14
p415G-Z	p415G carrying a fragment containing <i>rsmZ</i> gene; Tet ^r	This study
pRG970Km	Cloning vector for construction of transcriptional <i>lacZ</i> fusion, derived from pRG970b, Km ^r	15
pRG970Km-ZP	pRG970Km containing a 0.4kb fragment of the putative promoter region of <i>rsmZ</i> gene; Km ^r	This study

Ap^r, Km^r and Tet^r indicate resistance to ampicillin, kanamycin and tetracycline, respectively.

表 2 研究用引物
Table 2 The primer used in this study

Primers	Sequence(5'→3')	Restrict enzyme
RsmZ-L2495	A A C T G C A G A C C A T C G A A C G G G C G	<i>Pst</i>
RsmZ-L3332	A A G G A T C C G T C G A C A C A G G A C T G	<i>Bam</i> H
RsmZ-R3460	A A G G A T C C G C G A T T T T G T T C C A G G C A G C	<i>Bam</i> H
RsmZ-R4514	A A G A A T T C C A A C G C C A C C G A A C G C A G	<i>Eco</i> R
RsmZ-3183	A A G C A T G C A G A C G A C T A T G G A A G C C G	<i>Sph</i>
RsmZ-3544	A A G G A T C C A G A T C G C A G A C C T C G A A C	<i>Bam</i> H
RsmZ-P2965	T T G G A T C C T C A A G C G T T T G C G A G A G	<i>Bam</i> H
RsmZ-P3361	T T G G A T C C T T C C C A T C G T C C T T G A C	<i>Bam</i> H

1.1.2 主要试剂: 试验所需 *Taq* 酶、限制性内切酶和连接酶购自 TaKaRa 公司, 其它化学试剂均为分析纯。

1.2 DNA 操作和序列分析

细菌基因组的提取采用 CTAB 法, 质粒 DNA 的

提取采用碱裂解法。感受态细胞制备、质粒 DNA 的限制性酶切、连接、转化和琼脂糖凝胶电泳参考文献^[16],引物合成和序列测定由北京优博基因科技有限公司完成。序列分析采用的软件为 DNAMAN 和 BLAST。RNA 二级结构预测采用 MFOLD 软件 (www.bioinfo.rpi.edu/applications/mfold)。

1.3 菌株 2P24 *rsmZ* 基因、*dsbA* 基因、*phoP* 基因、*phoQ* 基因缺失突变体以及 *rsmZ* 基因互补菌株的构建

菌株 2P24 的 *rsmZ* 基因位于转录调控因子 RpoS 下游^[11],以 2P24 基因组为模板,以引物对 RsmZ-L2495/RsmZ-L3332 和 RsmZ-R3460/RsmZ-R4514 进行 PCR 扩增,得到 *rsmZ* 基因左右的两个侧翼序列,扩增长度分别为 848 bp 和 1070 bp,经相应限制性酶切后连接载体 pHSG299,得到缺失 127 bp *rsmZ* 基因的缺失载体 p299ΔRsmZ(图 1-A)。将 p299ΔRsmZ 导入 2P24 中进行二次同源重组^[12],筛选得到 *rsmZ* 基因缺失突变菌株,以 RsmZ-L2495 和 RsmZ-R4514 为引物,通过菌落 PCR 验证突变体。

为互补 *rsmZ* 基因缺失突变菌株,以引物对 RsmZ-3183/RsmZ-3544 扩增 *rsmZ* 完整基因片段,经 *Sph* 和 *Bam*H 双酶切后连接到穿梭质粒 pRK415G 中^[14],得到互补载体 pRK415G-Z。将该载体导入 *rsmZ* 基因缺失突变体 PM501 中,得到互补菌株 PM501-RsmZ。

DsbA 基因、*phoP* 基因和 *phoQ* 基因缺失突变体的构建方法与 *rsmZ* 基因缺失突变菌株的构建方法相同(相关内容另发表)。

1.4 *rsmZ* 基因转录报告载体的构建

以引物 RsmZ-P2965 和 RsmZ-P3361 经 PCR 扩增获得 *rsmZ* 基因的启动子区域 397bp DNA 片段,测序后连到载体 pRG970Km 上,得到 pRG970Km-ZP。质粒 pRG970Km 上带有无启动子的 *lacZ* 报告基因,新构建的质粒 pRG970Km-ZP 中 *lacZ* 基因在 *rsmZ* 基因启动子控制下表达。

1.5 抗生素 2,4-DAPG 的定量检测和β-半乳糖苷酶酶活测定

将野生型 2P24 及其衍生菌株在 LB 液体培养基中 28 °C,125 r/min 摇培 30 h 后,按照 1 : 1000 (V:V) 的比例接种于 40 mL 马铃薯葡萄糖培养液(PDB)(马铃薯 200 g,葡萄糖 20 g,水 1000 mL)中,继续培养 48 h,抗生素 2,4-DAPG 的提取和 HPLC 定量检测方法参见文献^[17]。

测定β-半乳糖苷酶活性时,将 2P24 及其衍生菌在试管中 28 °C,125 r/min 摇培 30 h 后按 1 : 1000 (V : V)

的比例接种到 40 mL LB 培养液中,继续培养 8 h 后开始取样,之后每间隔 2.5 h 取样,直到细菌生长达到稳定期,酶活测定方法见文献^[18]。

2 结果和分析

2.1 菌株 2P24 中 *rsmZ* 基因的克隆和分析

含有 *rsmZ* 基因的 4.5 kb *Eco*R 片段 (GenBank 登录号 EF587266.1) 在前期研究中克隆于 pBS-29-E 上^[11]。*rsmZ* 基因位于转录调控因子 *rpoS* 基因和铁氧还蛋白基因 *fdxA* 之间 (图 1-A)。以 RsmZ-3183 和 RsmZ-3544 为引物,PCR 扩增并克隆了包含 *rsmZ* 基因及其上游推测的-10 和-35 区在内的 168 bp 片段。序列分析表明菌株 2P24 的 *rsmZ* 基因与 *P. fluorescens* F113 的 *prfB* 基因(后更名为 *rsmZ*) 和 *P. fluorescens* CHA0 的 *rsmZ* 基因同源性分别达到 95%和 85% (图 1-B)。推测 *rsmZ* 基因转录产生的小 RNA 长度为 132 nt,经 MFOLD 软件分析其折叠后的二级结构具有 5 个茎-环结构,其中 4 个环部具有保守的 5'-GGA-3' 序列 (图 1-C)。

2.2 *RsmZ* 缺失突变体的构建

通过 PCR 扩增获取 *rsmZ* 基因左右两个侧翼序列,中间缺失 *rsmZ* 基因的 127 bp 片段,以此构建缺失载体 p299ΔRsmZ (图 1-A)。转化野生型 2P24 后,通过二次同源重组,获得了 *rsmZ* 基因的缺失突变体 PM501。利用 PCR 对缺失突变体进行验证,以 RsmZ-L2495 和 RsmZ-R4514 为引物,以野生型 2P24 和 PM501 为模板,所得扩增片段突变体应比野生型短 127 bp,电泳结果显示 PM501 的 *rsmZ* 基因片段有了明显缺失 (图 2),与预期结果一致。

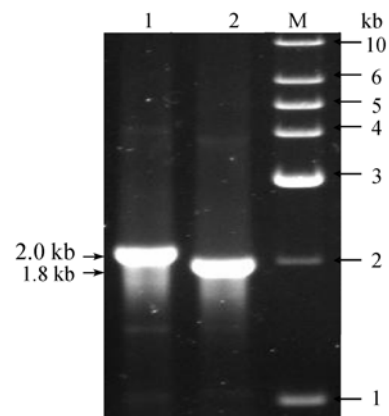


图 2 菌落 PCR 验证 *rsmZ* 基因缺失突变体

Fig. 2 Identification of *rsmZ* gene in-frame deletion by colony PCR. The fragments were amplified with primers RsmZ-L2495 and RsmZ-R4514 from 2P24 colony (1) and *rsmZ* gene mutant PM501 (2). M: Molecular weight marker.

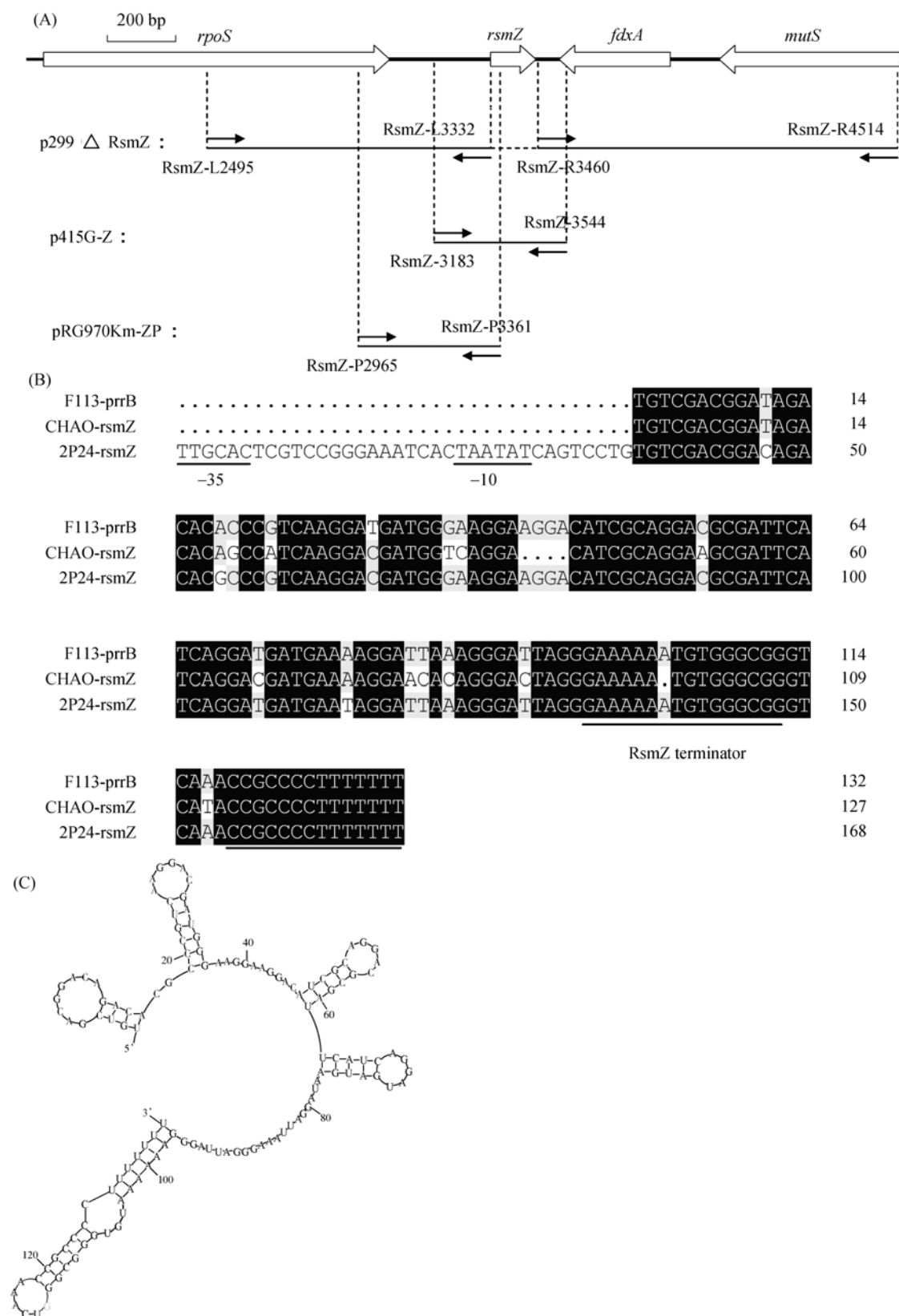
图 1 *rsmZ* 基因的序列比对和结构示意图

Fig. 1 Sequence and structure of *rsmZ* gene in *P. fluorescens* 2P24. A: Organization of the *rsmZ* region of *P. fluorescens* 2P24 and description of some vectors. B: Sequence alignment of *rsmZ* gene in *P. fluorescens* 2P24, *prpB* gene in *P. fluorescens* F113 and *rsmZ* gene in *P. fluorescens* CHA0, Terminator, -35 and -10 promoter sites of *P. fluorescens* 2P24 are indicated by underlining.

C: Predicted secondary structure of RsmZ in *P. fluorescens* 2P24 at 30°C using the MFOLD program.

2.3 *rsmZ* 基因缺失对抗生素 2,4-DAPG 产量的影响

菌株 2P24 产生的抗生素 2,4-DAPG 是其防病作用中的关键因子。2P24 在 PDB 培养基中摇培 48 h 后, 2,4-DAPG 的产量可达 0.0322 mg/(mL · OD_{600}) ; 而其 *rsmZ* 基因缺失突变体 PM501 在相同培养条件下抗生素 2,4-DAPG 产量显著减少, 仅有野生型的约 61% ; 互补菌株 PM501-RsmZ 的 2,4-DAPG 产量可恢复至野生型水平(图 3)。由此可见 *rsmZ* 基因在 2P24 中对抗生素 2,4-DAPG 的产生具有正调控作用。

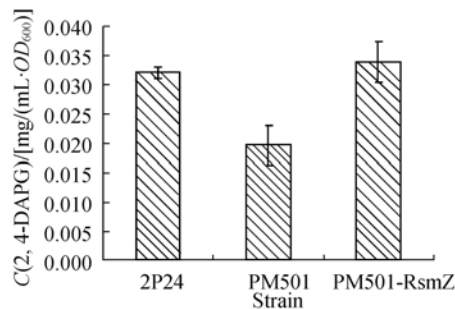


图 3 *P. fluorescens* 2P24 及其衍生菌抗生素产量
Fig. 3 Production of 2,4-DAPG in *P. fluorescens* 2P24 and its derivatives.

2.4 GacA 和 DsbA 对 *rsmZ* 基因转录的影响

在许多假单胞杆菌中, GacA 是调控次生代谢物质的全局性调控因子^[6]。GacA 突变菌株 PM201 中 β -半乳糖苷酶活性明显低于野生型, 说明 GacA 突变后 *RsmZ* 转录水平与 2P24 野生型相比显著下降, 表明 GacA 对 *rsmZ* 基因的转录具有正调控作用(图 4-A)。DsbA 是假单胞杆菌中的二硫键生成酶^[19], DsbA 突变菌株 PM106 中 *RsmZ* 转录水平与 2P24 野生型相比显著上升, 表明 DsbA 对 *rsmZ* 基因的转录具有负调控作用(图 4-B)。

2.5 PhoP/PhoQ 对 *rsmZ* 基因转录的影响

PhoP/PhoQ 是一套在细菌中通过感应环境中镁离子浓度变化, 调控许多基因表达的双因子调控系统^[20]。2P24 中 *phoP* 和 *phoQ* 基因突变体 PM404 和 PM402 菌体生长速度与其野生型没有明显区别, 菌株进入静止期后的 *rsmZ* 基因最大转录量也没有显著差异; 但在对数生长期, 酶活测定结果表明突变体 PM404 和 PM402 中的 *rsmZ* 基因转录水平明显低于野生型 2P24, 突变体 *rsmZ* 基因达到最大转录水平的时间也分别比野生型 2P24 滞后了约 2.5 h (图 5)。

3 讨论

本研究表明假单胞杆菌 2P24 中, 小 RNA RsmZ

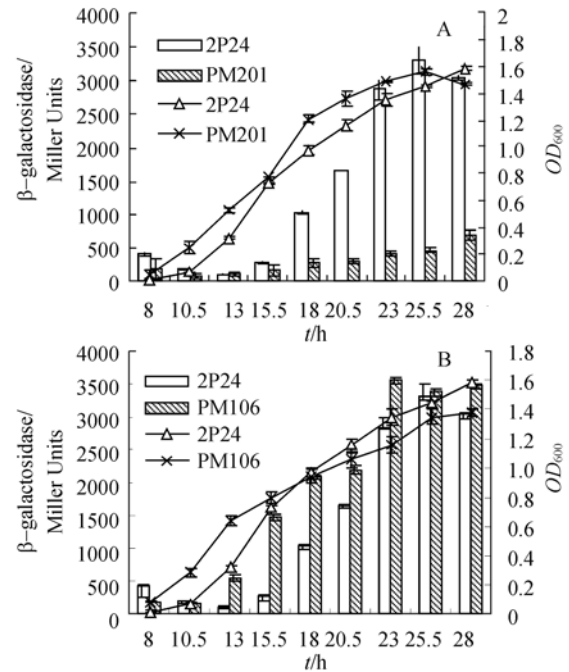


图 4 GacA(A)和 DsbA(B)对 *RsmZ* 转录的影响

Fig. 4 Effects of GacA (A) and DsbA (B) on transcription of *RsmZ*. Strain 2P24 and its mutants PM201(*gacA*⁻) and PM106(*dsbA*⁻) were grown in LB liquid medium. Samples were taken at various time points and OD_{600} (curves) and β -galactosidase activities (columns) were detected.

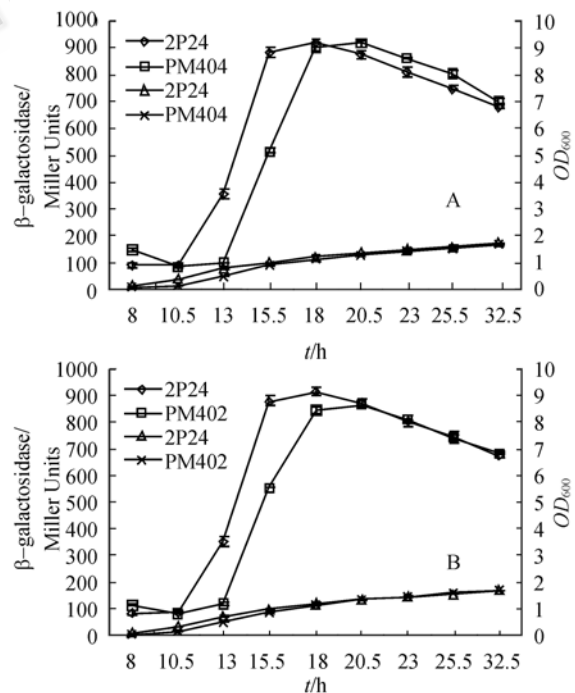


图 5 PhoP(A)和 PhoQ(B)对 *rsmZ* 基因转录的影响

Fig. 5 Effects of PhoP (A) and PhoQ (B) on transcription of *RsmZ*. Strain 2P24 and its mutants PM404(*phoP*⁻) and PM402(*phoQ*⁻) were grown in LB liquid medium. Samples were taken at various time points and OD_{600} (crosses and triangles) and β -galactosidase activities (squares and diamonds curves) were detected.

的转录受 GacS/GacA 双因子系统的正调控作用, RsmZ 又正调控抗生素的产量。这与菌株 CHA0 已报道结论基本一致^[2], 推测可能不同假单胞杆菌菌株中对抗生素 2,4-DAPG 合成的调控机制是相似的。同时, 本研究证明另一套双因子调控系统 PhoP/PhoQ 对 *rsmZ* 基因的转录也存在调控作用, 但其调控模式与 GacA 明显不同, PhoP/PhoQ 突变体与野生型 2P24 生长速率没有显著差异, *rsmZ* 基因的最大转录水平也没有显著差异, 但达到最大转录量的时间较野生型明显滞后; 而 GacA 突变体则是造成 *rsmZ* 基因的最大转录量下降。PhoP/PhoQ 对 *rsmZ* 基因转录调控尚未见有其他菌株的报道。

DsbA 是位于周质中的一个参与外泌蛋白二硫键形成的酶, 在 *P. fluorescens* Q8r1-96 中, DsbA 调控菌落形态、荧光强度、抗生素 2,4-DAPG 的产量等性状^[19]。在菌株 2P24 中, 已经证明 *dsbA* 基因负调控抗生素的产量和生物膜的形成(数据未发表), 但其具体调控机理不明。本研究证明 *dsbA* 基因对于 *rsmZ* 基因的转录具有负调控作用, 而 RsmZ 又能正调控抗生素的产生。因此, *dsbA* 基因对抗生素的负调控可能与 *rsmZ* 基因有关。

GacS/GacA、PhoP/PhoQ 和 DsbA 是假单胞菌中的重要调控因子, 分别调控着下游不同的生物学性状, 表现不同的遗传功能。但本文研究结果表明上述基因都直接或间接地影响了菌株 2P24 中小 RNA 因子 RsmZ 的转录, 从而可能共同影响到 RsmZ 调控的下游性状, 说明小 RNA 因子可能参与调控的遗传性状的数量远远超过了我们的想象。利用转录报告载体 pRG970Km-ZP, 进一步通过随机突变研究小 RNA RsmZ 的调控因子, 不仅有助于深入了解菌株 2P24 生防性状的表达机制, 也有利于进一步理解细菌胞内信号传递和调控网络。

参 考 文 献

- [1] 王晨红, 杨光, 邵宁生. 大肠杆菌中的小 RNA 调节子. 医学分子生物学杂志(*Journal of Medical Molecular Biology*), 2006, 6: 464-467.
- [2] Kay E, Dubuis C, Haas D. Three small RNAs jointly ensure secondary metabolism and biocontrol in *Pseudomonas fluorescens* CHA0. *Proc Natl Acad Sci. USA*, 2005, 102: 17136-17141.
- [3] Aarons S, Abbas A, Adams C, et al. A regulatory RNA (PrrB RN A) Modulates Expression of Secondary Metabolite Genes in *Pseudomonas fluorescens* F113. *J Bacteriol*, 2000, 182:3913-3919.
- [4] Heurlier K, Williams F, Heeb S, et al. Positive Control of Swarming, Rhamnolipid Synthesis, and Lipase Production by the Posttranscriptional RsmA/RsmZ System in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J Bacteriol*, 2004, 186: 2936-2945.
- [5] 王素莲, 耿海峰, 孙雷, 等. 假单胞菌 M18rsmA 突变株的构建及其对 Pit 和 PCA 合成的区别性调控作用. 微生物学报(*Acta Microbiologica Sinica*), 2004, 44(2): 189-193.
- [6] Heeb S, Haas D. Regulatory Roles of the GacS/GacA Two component System in Plant-Associated and Other Gram-Negative Bacteria. *Mol Plant Microbe Interact*, 2001, 14(12): 1351-1363.
- [7] Bejerano-Sagie M, Xavier KB. The role of small RNAs in quorum sensing. *Curr Opin Microbiol*, 2007, 10: 189-198.
- [8] 魏海雷, 王焯, 张力群, 等. 生防菌株 2P24 与 CPF-10 的鉴定及其生防相关性状的初步分析. 植物病理学报(*Acta Phytopathologica Sinica*), 2004, 34(1): 80-85.
- [9] 魏海雷, 周洪友, 张力群, 等. 抗生素 2,4-二乙酰基间苯三酚作为荧光假单胞菌 2P24 菌株生防功能因子的实证分析. 微生物学报(*Acta Microbiologica Sinica*), 2004, 44(5): 663-666.
- [10] Wei HL, Zhang LQ. Quorum-sensing system influences root colonization and biological control ability in *Pseudomonas fluorescens* 2P24. *Antonie van Leeuwenhoek*. 2006, 89: 267-280.
- [11] Yan Q, Wu XG, Wei HL, et al. Differential control of the PcoI/PcoR quorum-sensing system in *Pseudomonas fluorescens* 2P24 by sigma factor RpoS and the GacS/GacA two-component regulatory system. *Microbiol Res*, 2006: (2008), doi:10.1016/j.micres.2008.02.001.
- [12] 魏海雷, 张力群. 荧光假单胞杆菌 2P24 中生防相关调控基因 *gacS* 的克隆和功能分析. 微生物学报(*Acta Microbiologica Sinica*), 2005, 45(3): 368-372.
- [13] Hanahan D. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol*, 1983, 166: 55-7580.
- [14] Keen NT, Tamaki S, Kobayashi D, et al. Improved broad-host-range plasmids for DNA cloning in gram-negative bacteria. *Gene*, 1988, 70: 191-197.
- [15] van den Eede G, Deblaere R, Goethals K, et al. Broad host range and promoter selection vectors for bacteria that interact with plants. *Mol Plant Microbe Interact*, 1992, 5: 228-234.
- [16] Sambrook J, Russell DW. 分子克隆实验指南黄培堂, 等译. 第三版. 北京: 科学出版社, 2002.
- [17] 周洪友, 魏海雷, 刘西莉, 等. 通过染色体整合抗生素 2,4-二乙酰基间苯三酚合成基因提高荧光假单胞菌生防能力. 科学通报(*Chinese Science Bulletin*), 2005, 50(8): 766-771.
- [18] Miller JH. Experiments in Molecular Genetics. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, 1972.
- [19] Mavrodi OV, Mavrodi DV, Park AA, et al. The role of *dsbA* in colonization of the wheat rhizosphere by *Pseudomonas fluorescens* Q8r1-96. *Microbiology*, 2006, 152: 863-872.
- [20] Macfarlane ELA, Kwasnicka A, Ochs MM, et al. PhoP-PhoQ homologues in *Pseudomonas aeruginosa* regulate expression of the outer-membrane protein OprH and polymyxin B resistance. *Mol Microbiol*, 1999, 34(2): 305-316.

Regulation of *gacA*, *dsbA* and *phoP/phoQ* genes on the transcription of small RNA Gene *RsmZ* in *Pseudomonas fluorescens* 2P24

Weifang Jiang, Xiaogang Wu, Qing Yan, Liqun Zhang*

(Department of Plant Pathology, China Agricultural University, Beijing 100193, China)

Abstract:[Objective] *Pseudomonas fluorescens* 2P24 is a plant disease-suppressive bacterium isolated from wheat rhizosphere. Small RNA gene *rsmZ* in strain 2P24 plays an important role in the production of antibiotic 2,4-diacetylphloroglucinol (2,4-DAPG), a key factor in disease suppression. **[Objective]** The aim of this study was to determine the influence of upstream regulators on the transcription of *rsmZ*. **[Methods]** A reporting vector was constructed by fusing the promoter region of *rsmZ* gene with a promoterless *lacZ* gene on plasmid pRK970Km. The resulting plasmid was introduced into several regulatory gene mutants and the corresponding effects on RsmZ transcription were investigated. **[Results]** The results indicated that a response regulator gene *gacA* from GacS/GacA two-component system positively regulated the transcription of RsmZ, whereas the oxidoreductase gene *dsbA* negatively regulated RsmZ expression. Furthermore, mutation on PhoP/PhoQ two-component system resulted in the delay of RsmZ transcription. **[Conclusion]** Our study suggests that the *rsmZ* gene in strain 2P24 transcripts under the pleiotropic regulation of a number of upstream genes, and may be involved in a more complex signal transduction cascade than that we have known.

Keywords: *Pseudomonas fluorescens*; small RNAs; RsmZ; transcription

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30671403), National Programs for High Technology Research and Development of China (2006AA10A211) and the Chinese MOST-DEST Cooperation Project (2007DFA31570)

*Corresponding author. Tel: +86-10-62731464; E-mail: zhanglq@cau.edu.cn

Received: 20 May 2008/ Revised: 29 August 2008

1953 年创刊以来所有文章全文上网

2008 年 1 月中旬,《微生物学报》自 1953 年创刊以来的文章全文上网啦!欢迎广大读者登陆本刊主页 (<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>)浏览、查询、免费下载摘要和全文!

建立全文数据库的工作是从 2007 年初开始,经过多方人员的共同努力,历经半年多时间成功完成。由于《微生物学报》历史悠久,其间经历了期刊的变化。将变化情况统计如下,以供读者查阅参考。

《微生物学报》刊、期统计表

(2008 年 12 月统计)

时间	刊期	卷号	期号
1953~1956	半年刊	1~4	1~2
1957~1958	季刊	5~6	1~4
1959	季刊	7	1~2
1959~1962	停刊 3 年		
1962	季刊	8	3~4
1963~1965	季刊	9~11	1~4
1966	季刊	12	1~2
1966~1972	停刊 6 年半		
1973~1988	季刊	13~28	1~4
1989~2007	双月刊	29~47	1~6
2008	月刊	48	1~12